

EFFET LYTIQUE DE CERTAINES PROTEASES
LYSOSOMIALES DE LEUCOCYTES HUMAINS
SUR LE TISSU GINGIVAL

THESE

présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

René HEINIGER

de

ERISWIL (Berne)

Thèse No 352

EYSINS
Imprimerie C. Gloor-Luder
1979

EFFET LYTIQUE DE CERTAINES PROTEASES
LYSOSOMIALES DE LEUCOCYTES HUMAINS
SUR LE TISSU GINGIVAL

THESE

présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par
René HEINIGER

de
ERISWIL (Berne)

Thèse No 352

EYSINS
Imprimerie C. Gloor-Luder
1979

La Faculté de Médecine, sur le préavis du professeur Giorgio Cimasoni, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 24 avril 1979

Le Doyen :
André Cruchaud

Thèse No 352



Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à toutes les personnes qui nous ont aidé à réaliser ce travail par leur active collaboration, leurs précieux conseils et leurs encouragements bienveillants.

Que soient tout particulièrement remerciés :

- le professeur G. Cimasoni, qui a dirigé ces recherches avec enthousiasme et nous a fait bénéficier de ses judicieuses critiques.
- les professeurs L.J. Baume et J. Holz, pour avoir aimablement mis à notre disposition le cryostat nécessaire à l'obtention des coupes.
- Mademoiselle E. Andersen, qui a effectué avec beaucoup de soin les travaux d'histologie et les photos.
- Madame I. Condacci, qui a purifié l'élastase.
- Madame M. Rénier, qui a eu l'obligeance de dactylographier le texte sous sa forme définitive.

Le présent travail a bénéficié de l'aide financière du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (No 3.604.0-75).

A MES ENFANTS

A MA FEMME

A MES PROCHES

1. INTRODUCTION

La santé gingivale dépend d'un équilibre entre certaines bactéries de la flore buccale, constituant la plaque bactérienne (67,34), et les moyens de défense de l'organisme. La gingivite (90,22,64) se manifeste lorsque cet équilibre est rompu et la lésion peut, plus ou moins rapidement, évoluer vers la parodontite (68). L'inflammation envahit alors les structures profondes du parodonte, altérant plus ou moins gravement les tissus de soutien ainsi que l'os alvéolaire (93). Le développement de ce processus inflammatoire est étroitement lié à la présence de plaque bactérienne au niveau de la gencive marginale. En effet, de très nombreux auteurs ont démontré que les bactéries de la plaque et leurs produits sont les facteurs étiologiques primordiaux des gingivites et des parodontites (8,29, 80,60,35,63,72,21,87). En plus de leur action cytotoxique directe sur les structures du parodonte, la plupart de ces substances bactériennes sont capables de déclencher chez l'hôte, des réactions immunologiques de différents types (5), ainsi qu'une réponse inflammatoire (70). Si ces réactions sont nécessaires pour la défense de l'organisme, elles peuvent dans des circonstances encore mal connues, prendre des proportions excessives et aboutir à une destruction tissulaire (51,69,86,17,45,62,73,46). Par exemple, lors de ces réponses immunes et en général dans tout processus inflammatoire, certaines enzymes de l'hôte lui-même et en particulier les enzymes lysosomiales, peuvent être libérées et causer ainsi des lésions tissulaires (97,41,33,71,89,96).

Les lysosomes, découverts par de Duve en 1949 (24), sont des particules intracytoplasmiques renfermant la presque totalité des hydrolases cellulaires. Les lysosomes sont probablement présents dans toutes les cellules de l'organisme, mais certaines espèces en sont particulièrement pourvues comme les cellules du système réticulo-endothélial et les granulocytes. Les lysosomes interviennent dans de nombreuses réactions physiologiques (10,26) par exemple lors de la régénération tissulaire, en lysant, dans une vacuole d'autophagie,

des constituants cellulaires vieillis ou mal élaborés. Lors de la phagocytose de matériel exogène, les hydrolases lysosomiales se déversent secondairement dans la vacuole de phagocytose. Les lysosomes interviennent également dans la régression de certains organes de durée éphémère tels les canaux de Müller ou lors de l'involution de l'utérus post-partum.

La membrane lysosomiale, qui met la cellule à l'abri de son auto-digestion, peut, dans certaines conditions pathologiques, être fragilisée. Le contenu enzymatique des lysosomes devient alors agressif pour les constituants cellulaires normaux, provoquant ainsi des altérations structurales et fonctionnelles variées (50,1,25). Cette fragilisation de la membrane lysosomiale peut être provoquée par de nombreuses substances telles que les toxines bactériennes, les virus, les carbures cancérigènes, les poussières de silice ainsi que les radiations ionisantes (17,95,85,83). Cochrane (16), Horton, Oppenheim et Mergenhausen (45) ont démontré que la présence du complexe antigène-anticorps et complément provoquait l'accumulation chémotaxique de polynucléaires neutrophiles et que l'ingestion de ces complexes par les neutrophiles s'accompagnait d'une libération d'enzymes lysosomiales. D'autre part, la dégradation de ces complexes produit des substances, notamment des ions H^+ , qui favorisent la labilité des lysosomes, aboutissant ainsi à une libération excessive d'enzymes.

Un certain rôle des enzymes lysosomiales a également été préconisé dans la pathogénie des parodontites (80,98,40,4). Cimasoni et ses collaborateurs (6) ont montré, lors de gingivites expérimentales chez l'homme, une augmentation significative d'enzymes lysosomiales, (phosphatase acide, β -glucuronidase et cathepsine D) en corrélation avec le degré d'inflammation. Schroeder et Lange (61), ainsi que d'autres auteurs (100,44,23), en étudiant les différents éléments cellulaires présents dans la région du sillon gingival, ont démontré que les leucocytes polynucléaires, les macrophages ainsi que les

cellules épithéliales du sillon et de l'épithélium jonctionnel étaient capables de phagocytose, accompagnée d'une libération d'enzymes lysosomiales. Tynelius-Bratthal et Attström (92) ont démontré lors d'une gingivite expérimentale chez le chien, une augmentation de la concentration de phosphatase acide, de hyaluronidase et des protéases, accompagnée d'une augmentation du nombre de leucocytes au niveau du fluide gingival. Inversement, ils ont montré une diminution de la concentration de ces enzymes, ainsi que du nombre des leucocytes lorsque la gencive redevenait saine. Attström, Tynelius-Bratthal et Egelberg (3) ont constaté une récession de la gingivite expérimentale chez le chien lorsque celui-ci était rendu leucopénique, ceci étant accompagné d'une diminution de la concentration en phosphatase acide et en hyaluronidase au niveau du sillon gingivo-dentaire. Gustafson (39) a observé que des visons souffrant d'une anomalie lysosomiale (le syndrome de Chediak-Higashi) développent plus facilement une parodontite que des animaux sains. Page, Davies et Allison (79) ont démontré que des macrophages en cultures, mis en présence de plaque dentaire, étaient capables de libérer des hydrolases lysosomiales.

Les travaux que nous venons de citer permettent de penser que les lysosomes et leur contenu enzymatique pourraient jouer un rôle important dans le développement de la maladie parodontale.

Les leucocytes contiennent des protéases agissant à un pH neutre ou légèrement alcalin, soit une collagénase, une élastase et une cathepsine G (97,9) et des protéases agissant à un pH acide, telles les cathepsines A,B,C,D et E. La cathepsine D semble la plus importante des enzymes acides et sa présence au niveau du sillon gingivo-dentaire a été largement étudiée (50,14,94,32,36).

L'étude des protéases neutres a pris une importance considérable ces dernières années. En raison de leur activité maximale en pH physiologique, il est possible que ces enzymes jouent un rôle parti-

culièrement important dans le processus de dégradation en milieu extracellulaire (7). Janoff (55,58) a montré qu'il existe dans les polynucléaires humains (PMNs), une enzyme protéolytique active au pH neutre, ayant des similitudes d'action avec l'élastase pancréatique et dénommée pour cette raison "élastase-like" enzyme. Cette enzyme a été purifiée par cet auteur en 1973 (54) et par Ohlsson et Olsson en 1974 (76). Elle a également été isolée récemment dans notre laboratoire par Ishikawa et Cimasoni (49). De nombreux travaux ont démontré l'action de l'élastase de PMNs humains, in vivo et in vitro, sur plusieurs variétés de tissus. Janoff et Blondin (56) ont par exemple montré la dégradation du cartilage articulaire de lapin, incubé au pH 7.5, avec la fraction élastinolytique des PMNs. Oronsky, Perper et Ignarro (78,81) ainsi que Malemud et Janoff (66) ont montré que la fraction granulaire contenant l'élastase était capable de libérer rapidement le sulfate du cartilage articulaire de lapin, rendu radioactif par l'injection de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ intraveineux. Ces résultats suggèrent que cette protéase neutre joue un rôle important dans la pathogénie articulaire. Janoff et Zeligs (59), Janoff, Sandhaus et Hospelhorn (57), ainsi que Golub et Spitznagel (20) ont montré que l'injection, sous la peau de lapin et les poumons de souris, de la fraction granulaire de PMNs humains contenant l'élastase, produisait des lésions hémorragiques. L'injection de cette enzyme dans la paroi aortique de chien (52) est suivie d'une forte diminution de la coloration des fibres élastiques de la tunique moyenne et de l'adventice après quelques heures. D'autre part, l'incubation de la membrane basale de vaisseaux sanguins et des poumons de souris avec la fraction granulaire montre un maximum d'activité au pH neutre.

Récemment, l'action de l'élastase sur les peptides terminaux de la molécule de collagène a également été démontrée (88,27,53,77).

Le but de ce travail a été de montrer l'effet lytique de certaines protéases lysosomiales de leucocytes humains sur le tissu gingival. A cet effet des biopsies de gencive humaine ont été coupées au cryostat. Puis les coupes ont été incubées avec trois préparations enzymatiques et colorées.

2. MATERIEL ET METHODES

Trois préparations enzymatiques obtenues à partir de leucocytes de sang humain ont été utilisées dans le travail présent : la fraction granulaire totale au pH 7.3, l'élastase purifiée au pH 7.0 et la fraction granulaire totale au pH 3.6. Elles ont été purifiées selon une méthode standard pour la séparation des leucocytes du sang (84,31) adaptée à nos besoins par Ishikawa et Cimasoni. En résumé les leucocytes ont été obtenus par sédimentation au dextran à partir de 500 ml de sang héparinisé, mélangé avec 500 ml de solution NaCl à 0,9 % contenant 5 % de dextran. La partie contenant les PMNs, les mononucléaires et quelques erythrocytes a ensuite été centrifugée et le reste des erythrocytes lysés au moyen d'une solution hypotonique. Puis les leucocytes ont été lavés trois fois dans une solution saline et une fois dans une solution de sucrose 0.34 M.

Préparation de la fraction granulaire

Les leucocytes ont été remis en suspension dans 10 ml d'une solution de sucrose 0.34 M., homogénéisés cinq fois de suite à 4°C avec un homogénéisateur Potter-Elvehjem et soumis à des centrifugations différentielles, d'abord à 700 g pendant 10 min., puis à 20 000 g pendant 20 min. pour obtenir une fraction granulaire contenant les lysosomes. La lyse des granules pour la libération des enzymes a été obtenue en mélangeant vigoureusement le sédiment pendant 10 min. avec un tampon acétate 0,1 M au pH 4.5, puis en laissant reposer pendant 30 min. Ce mélange a été soumis à une ultra-centrifugation de 20 000 g pendant 30 min. On obtient ainsi la fraction enzymatique totale dans le surnageant, avec une concentration protéinique d'environ 2250 µg/ml. Cette préparation enzymatique a été ajustée aux pH 7.3 et 3.6. Pour obtenir le pH de 7.3 on a ajouté du tampon phosphate 0,1 M au pH de 8, alors que pour ajuster la préparation enzymatique au pH acide on a utilisé du tampon acide citrique-citrate de sodium au pH 3.0.

Purification de l'élastase

Pour obtenir l'élastase utilisée dans le travail présent, l'extraction des protéines solubles de la fraction granulaire, a été faite par trois congélations et décongélations successives dans un tampon phosphate 0,01 M contenant du NaCl à 0,15 M au pH de 7.0. Puis l'enzyme a été purifiée par chromatographie au Sephadex G 75 superfine avec le même tampon. On obtient ainsi une protéase neutre partiellement purifiée (49) donnant trois bandes à l'électrophorèse et présentant les mêmes caractéristiques que l'enzyme "elastase-like" (54,76) avec une concentration protéinique d'environ 42 µg/ml.

Préparation des coupes

Pour obtenir les coupes nécessaires à l'expérimentation, des échantillons de gencive marginale et de papilles interdentaires ont été prélevés lors de gingivectomies-gingivoplasties effectuées sur des patients souffrant de parodontite simple. Après un léger lavage dans une solution isotonique de NaCl, les biopsies ont été immédiatement placées sur un socle de microtome et congelées dans une chambre à congélation, basée sur la décompression du Co₂. Après congélation, chaque échantillon a été placé dans un cryostat (cryo-cut Models 849 C, American optical corporation, Buffalo, N.Y.) préalablement refroidi à -30°C et laissé en place pendant 30 min. Puis chaque biopsie a été sectionnée en séries de coupes de 10 µm d'épaisseur. Chaque coupe a été récupérée sur des lames porte-objets ayant la température de la pièce et maintenues à -30°C jusqu'à leur utilisation. Pour chaque biopsie on a cherché à obtenir des paires de coupes en série dont l'une a été soumise à l'action de la préparation enzymatique et l'autre au tampon correspondant en l'absence d'enzyme. Ceci a été obtenu en déposant quelques gouttes de solution d'enzyme ou de tampon seul sur les coupes et en plaçant ces dernières dans une étuve à 37°C pendant des durées de temps variant de une demi-heure à vingt heures.

En ce qui concerne l'élastase, des contrôles supplémentaires ont été effectués avec un inhibiteur spécifique de cette enzyme,

le phénylméthane sulphonyl fluoride (Pms-F). Dans ce but on a cherché à obtenir des séries de trois coupes dont la première a été incubée avec le tampon seul, la deuxième avec la préparation enzymatique et la troisième avec la même préparation en présence de Pms-F. Le Pms-F a été dissous avec du propanol-2 et mélangé au tampon contenant l'élastase, à la concentration finale de 3 mM. Des analyses de l'activité enzymatique, effectuées selon la méthode de Anson modifiée (2), ont en effet montré que déjà à la concentration de 2 mM de Pms-F, l'enzyme était inhibée à environ 90 %. En augmentant cette concentration, le degré d'inhibition ne variait pratiquement plus.

Colorations

Outre la coloration classique à l'hématoxyline-éosine, d'autres colorants ont été utilisés, tels le trichrome de Goldner qui permet un diagnostic différentiel des structures du conjonctif, l'orcéine qui est un colorant spécifique des fibres élastiques ainsi que deux méthodes de coloration histochimique, la coloration au PAS et la technique de Hale, employées toutes deux en raison de leur spécificité pour certains composants tissulaires de la gencive (91,42,15). Les colorations ont toujours été faites sur des paires de coupes en série, pour chacune des préparations enzymatiques, comme décrit précédemment, soit une coupe témoin et l'autre traitée avec une enzyme. Voici un résumé de ces différentes techniques.

Colorations au trichrome de Goldner (Masson modifiée)

La coloration trichromique est basée sur l'emploi de trois colorants différents, l'hématoxyline qui colore les noyaux en rouge foncé, la fuchsine-ponceau qui colore le cytoplasme en rouge et le vert lumière qui colore le conjonctif en vert (28).

Coloration à l'orcéine

Cette technique colore spécifiquement les fibres élastiques

en brun. Elle est généralement associée à une contre-coloration à l'hématoxyline ou au rouge solide qui fait apparaître les autres structures tissulaires (74).

Coloration au PAS

Cette technique est basée sur la libération, par oxydation à l'acide périodique, des groupes aldéhydes contenus dans des substances très variées, telles que les polysaccharides, les substances mucoïdes, les glycolipides. Ces substances oxydées sont ensuite colorées en rouge pourpre par le réactif de Schiff. Cette coloration est spécifique pour la mise en évidence du glycogène, des mucopolysaccharides neutres et des mucoprotéines (30).

Coloration selon la technique de Hale

Cette technique comprend d'abord une imprégnation par du fer colloïdal, qui se fixe sur les groupes anioniques des mucopolysaccharides acides ainsi que sur les radicaux carboxyles et sulfates. Le fer ainsi fixé est ensuite coloré en bleu foncé par la formation de ferrocyanure de potassium. Cette technique est spécifique pour la mise en évidence des mucopolysaccharides acides de la substance fondamentale du tissu conjonctif et cartilagineux (91). Elle nécessite une seconde coloration, au rouge pour noyau ou au PAS, pour colorer les autres éléments cellulaires (30).

RESULTATS

Effets de l'incubation avec la fraction granulaire totale au pH 7.3

L'incubation des coupes avec la fraction granulaire au pH 7.3 cause une destruction importante au niveau de l'épithélium, ce qui se traduit par une forte diminution de sa colorabilité (fig. 1b, 1c, 2b). Le cytoplasme des cellules épithéliales semble être la partie tissulaire la plus sensible à l'attaque enzymatique et disparaît en grande partie après deux heures d'incubation (fig. 1c). Les espaces intercellulaires sont également très sensibles, surtout au niveau de la couche épineuse (fig. 2b). Les noyaux des cellules épithéliales, bien que très altérés, sont souvent parmi les derniers éléments à être digérés (fig. 1c, 2b). Le tissu conjonctif est moins attaqué que l'épithélium. Cependant on observe, à ce niveau également, une diminution de la colorabilité, ce qui pourrait signifier une digestion partielle de la substance fondamentale. Il semble qu'il y ait également certaines modifications structurales au niveau des fibroblastes (fig. 1c) et que l'orientation des faisceaux de fibres conjonctives soit plus difficile à distinguer sur les coupes soumises aux enzymes (fig. 1b, 1c, 2b).

La figure 1 représente une coupe témoin d'une biopsie de la région rétromolaire supérieure, prélevée lors d'une plastie de la tubérosité. La coloration au trichrome de Goldner montre bien les différentes structures de l'épithélium et du conjonctif. Ainsi la couche de cellules basales est bien marquée et au niveau de la couche épineuse, on voit nettement les espaces intercellulaires. La couche granuleuse montre une forte concentration de colorant et au fort grossissement on distingue de nombreuses granulations. Au niveau de la couche cornée, assez épaisse en raison de l'origine anatomique de la biopsie, on remarque la persistance des membranes cellulaires : il s'agit donc vraisemblablement d'une pseudokératini-

sation. Dans le conjonctif on voit de nombreux fibroblastes et des faisceaux de fibres collagènes. Après une demi-heure d'incubation seulement, comme on peut le voir sur la figure 1b, on observe déjà une diminution générale de la coloration, une disparition des granules au niveau de l'épithélium ainsi qu'un décollement entre le conjonctif et la basale. On retrouvera fréquemment ce décollement au sommet des digitations acantosiennes également sur les autres coupes soumises à la préparation enzymatique. Avec une incubation de deux heures (fig. 1c), l'épithélium montre une très forte destruction, les cellules étant vidées de leur contenu cytoplasmique. La couche basale semble la plus résistante. Par contre au niveau de la couche épineuse on ne voit plus que des restes de noyaux et des débris d'espaces intercellulaires. La couche cornée, très décolorée, est séparée du reste de la coupe, suite semble-t-il, à une disparition complète de la couche granuleuse. Le tissu conjonctif au niveau de cette coupe est peu modifié, à part une diminution de coloration évidente au niveau de la substance fondamentale. Les colorations histochimiques par le PAS et la technique de Hale n'ont pas permis d'obtenir des résultats supplémentaires, mais confirment la grande sensibilité de l'épithélium gingival aux attaques de la fraction granulaire. Avec la coloration à l'orcéine on peut voir que la gencive marginale ne contient presque pas de fibres élastiques (fig. 2a). La figure 2b confirme le pouvoir destructeur de la fraction granulaire au niveau de l'épithélium.

Effets de l'incubation avec l'élastase

L'incubation avec l'élastase a donné des résultats semblables à ceux décrits pour la fraction granulaire au pH 7.3. Ainsi, après deux heures d'incubation, on constate que l'élastase attaque fortement l'épithélium (fig. 3b,4b,5b,6b). Au niveau des couches épineuses et granuleuses, le cytoplasme des cellules est plus ou moins complètement digéré. Les noyaux, bien que toujours présents, sont fortement attaqués : ils semblent cependant d'autant plus résistants que l'on s'approche de la couche basale. Au niveau du conjonctif, l'élastase

semble produire des destructions plus importantes que la fraction granulaire. Ainsi la colorabilité de la substance fondamentale est plus fortement diminuée; les fibroblastes montrent des altérations importantes et l'orientation des faisceaux de fibres conjonctives est difficile à distinguer. Si l'on compare une coupe-témoin (fig. 3a) avec la coupe en série incubée à l'élastase (fig. 3b), on constate, après deux heures d'incubation, une décoloration massive de l'épithélium, les cellules basales étant moins détruites que le reste de l'épithélium. Par contre dans les autres couches de l'épithélium on n'aperçoit plus que des restes de noyaux et de matériel intercellulaire. Au niveau du tissu conjonctif, à part les altérations déjà citées, on constate, au fort grossissement, que les fibroblastes sont déformés et décolorés par l'action de l'enzyme.

En ce qui concerne les colorations histochimiques, celles-ci confirment en grande partie les observations faites avec les techniques de coloration classiques. Les colorations au PAS et par la technique de Hale ont cependant permis d'observer un comportement différent du matériel intercellulaire au niveau de l'épithélium, suivant que celui-ci a été coloré au PAS ou au fer dialysé. Comme le montre un agrandissement au niveau de l'épithélium (fig. 4d, 5d), une incubation de deux heures semble faire disparaître complètement le matériel intercellulaire dans la coupe colorée au Hale, (fig. 5d) alors que ceci n'est pas le cas pour le PAS (fig. 4d). Pour les deux colorations, les coupes témoins (fig. 4c, 5c) montrent pourtant des espaces intercellulaires bien colorés.

Les incubations faites en présence de l'inhibiteur spécifique de l'élastase, le Pms-F, semblent prouver que l'effet destructeur obtenu sur les tissus est dû uniquement à l'action de l'enzyme. En effet, comme le montre la figure 6c, une incubation à la protéase neutre aussi longue que seize heures ne produit que très peu d'altérations en présence de l'inhibiteur.

Effets de l'incubation avec la fraction granulaire au pH 3.6

L'incubation avec la fraction granulaire au pH 3.6 a été faite avec quelques coupes de la même biopsie que celles utilisées pour l'incubation avec la fraction granulaire au pH 7.3. Il semble que la fraction granulaire au pH acide n'ait que peu d'effet sur l'épithélium. Après six heures d'incubation, comme le montre la figure 7b, on ne voit pas d'altérations de l'épithélium dans ces conditions, si ce n'est une diminution générale de la colorabilité et une disparition des granulations. A ce même pH, après vingt heures d'incubation on observe en plus une disparition presque totale de la membrane basale (fig. 7c). Il semble cependant qu'il n'y ait pas d'altérations supplémentaires au niveau des autres structures épithéliales. Par contre le tissu conjonctif semble être beaucoup plus sensible. Comme le montre la figure 7b, une incubation de six heures produit une forte diminution de la colorabilité au niveau de tous les éléments du conjonctif. La substance fondamentale semble être la partie la plus sensible. Il en résulte une destruction de ce tissu après vingt heures d'incubation, comme on peut le voir sur la figure 7c.

Figure 1

Fig. 1a

Coupe témoin de gencive prélevée au niveau d'une tubérosité du maxillaire supérieur et incubée pendant deux heures avec du tampon phosphate au pH 7,3 en l'absence d'enzyme. Coloration au trichrome de Goldner (cas 451/35).

Fig. 1b

Coupe de la même biopsie, incubée pendant une demi-heure avec la fraction granulaire totale dans le tampon phosphate au pH 7.3. On remarque une diminution générale de la colorabilité ainsi qu'un décollement entre le conjonctif et la basale de l'épithélium. Coloration au trichrome de Goldner (cas 451/29).

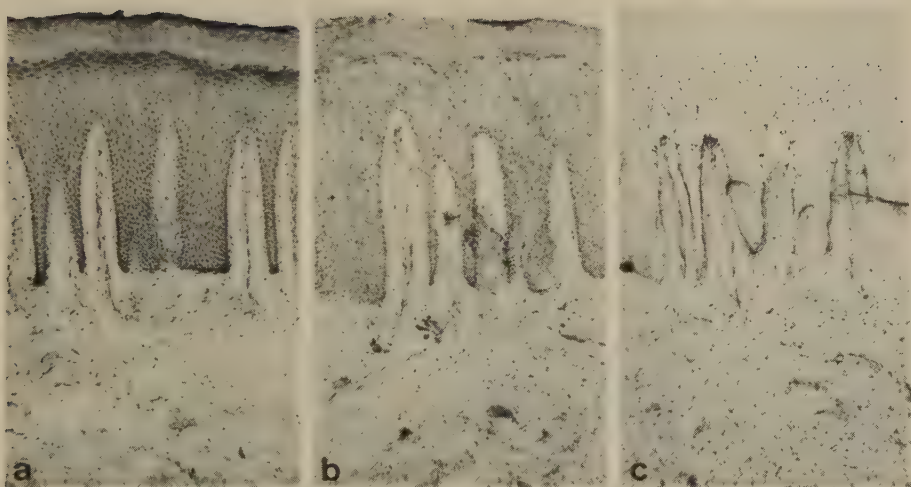


fig.1.

Fig. 1c

Coupe en série de celle de la figure 1a, incubée pendant deux heures avec la fraction granulaire totale dans le tampon phosphate au pH 7.3.

L'épithélium montre une très forte destruction : au niveau de la couche épineuse on ne voit plus que des restes de noyaux et des débris de matériel intercellulaire. Au niveau du conjonctif on remarque une diminution de la colorabilité de la substance fondamentale.

Coloration au trichrome de Goldner (cas 451/27).

Figure 2

Fig. 2a

Coupe témoin de gencive marginale, incubée pendant deux heures avec du tampon phosphate au pH 7,3 en l'absence d'enzyme. Coloration à l'orcéine (cas 319/27).

Fig. 2b

Coupe en série incubée pendant deux heures avec la fraction granulaire totale dans le tampon phosphate au pH 7,3. Cette image confirme le pouvoir destructeur de la fraction granulaire au niveau de l'épithélium. Coloration à l'orcéine (cas 319/23).

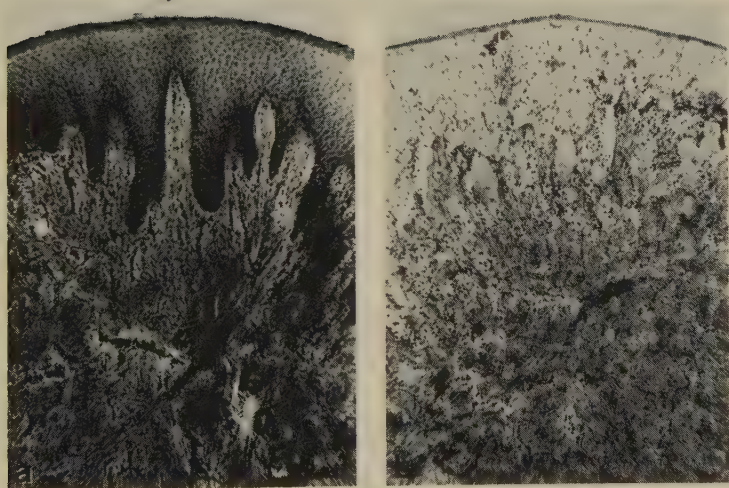


fig.2.

Figure 3

Fig. 3a

Coupe témoin de gencive marginale humaine incubée pendant deux heures avec du tampon phosphate au pH 7,0 en l'absence d'enzyme. Coloration à l'hématoxyline-éosine (cas 316/7).

Fig. 3b

Coupe en série incubée pendant deux heures avec l'élastase dans le tampon phosphate au pH 7,0.

On remarque la très forte destruction de l'épithélium et, au niveau du conjonctif, une diminution de coloration de la substance fondamentale ainsi qu'une altération des fibroblastes. Il semble également que l'orientation des faisceaux de fibres conjonctives soit plus difficile à distinguer.

Coloration à l'hématoxyline-éosine (cas 316/8).

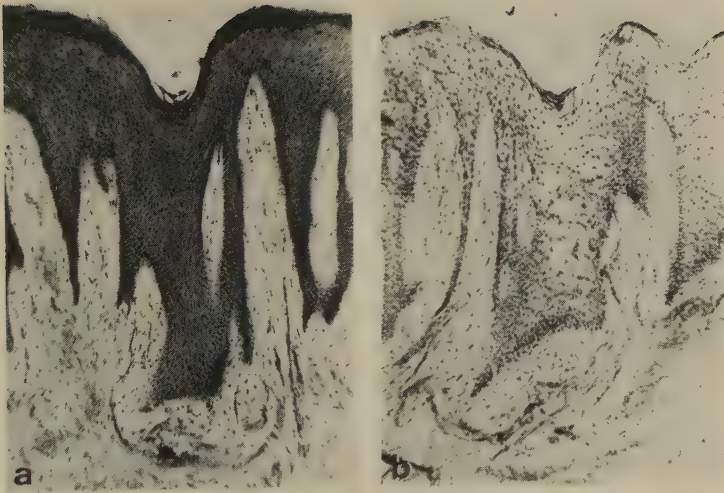


fig.3.

Figure 4

Fig. 4a

Coupe témoin de gencive marginale humaine incubée pendant deux heures avec du tampon phosphate au pH 7,0 en l'absence d'enzyme et colorée au PAS.

On observe du matériel PAS positif au niveau des espaces intercellulaires et de la membrane basale. (cas 316/3).

Fig. 4b

Coupe en série incubée pendant deux heures en présence d'élastase dans le même tampon phosphate.

On remarque que le matériel PAS positif est encore bien visible malgré la forte destruction de l'épithélium. (cas 316/4).

Fig. 4c

Agrandissement au niveau de l'épithélium de la coupe témoin (Fig. 4a) montrant le matériel PAS positif des espaces intercellulaires.

Fig. 4d

Agrandissement au niveau de l'épithélium de la coupe incubée avec l'élastase (Fig. 4b) montrant que le matériel PAS positif des espaces intercellulaires est encore bien visible.

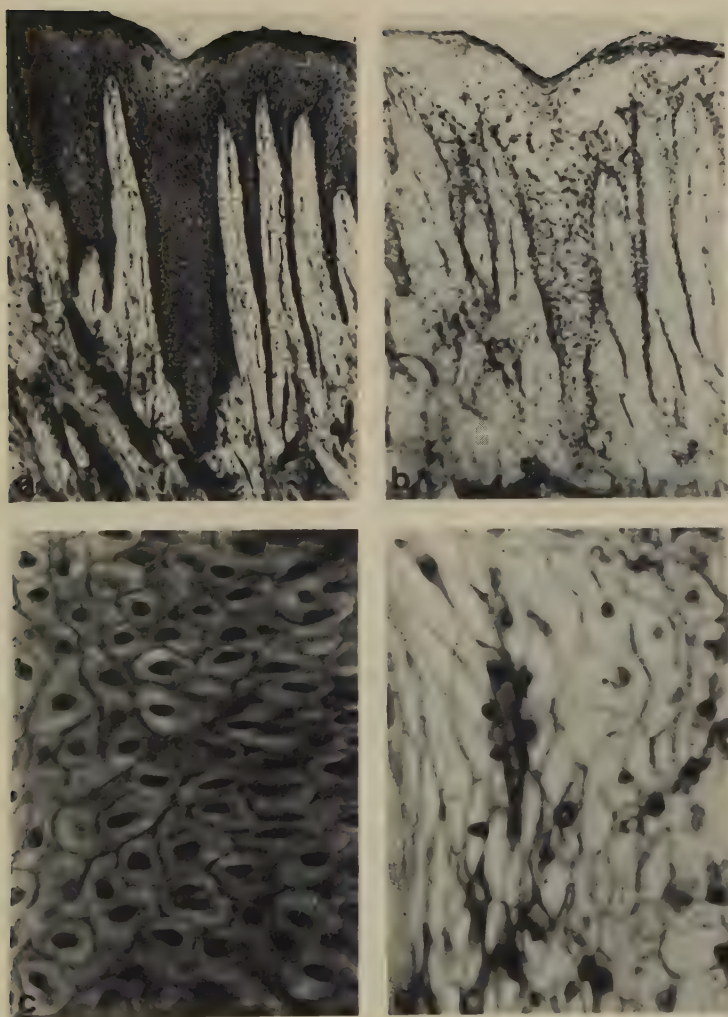


fig. 4.

Figure 5

Fig. 5a

Coupe témoin de gencive marginale humaine incubée pendant deux heures avec du tampon phosphate au pH 7,0 et colorée suivant la technique de Hale.

On observe du matériel Hale positif au niveau des espaces intercellulaires et de la membrane basale. (cas 316/21).

Fig. 5b

Coupe en série incubée pendant deux heures en présence d'élastase dans le tampon phosphate au pH 7,0.

On remarque que le matériel Hale positif a presque totalement disparu. (cas 316/20).

Fig. 5c

Agrandissement au niveau de l'épithélium de la coupe témoin (Fig. 5a) montrant le matériel Hale positif des espaces intercellulaires.

Fig. 5d

Agrandissement au niveau de l'épithélium de la coupe incubée avec l'élastase (Fig. 5b). Le matériel Hale positif des espaces intercellulaires a presque totalement disparu.

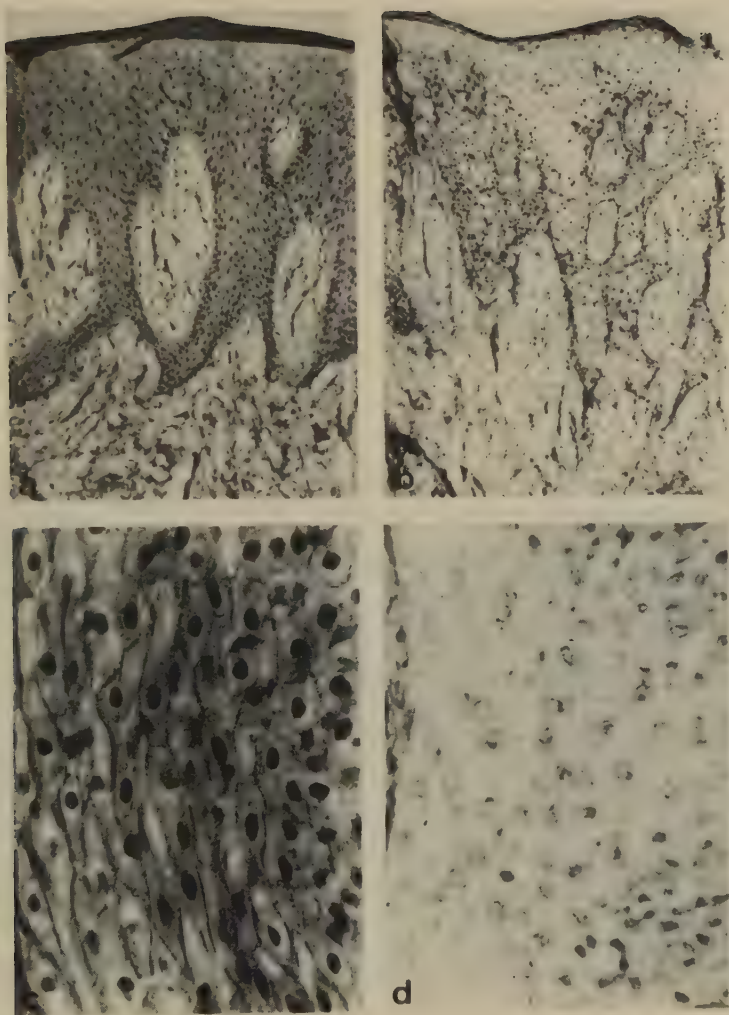


fig. 5.

Figure 6

Fig. 6a

Coupe témoin de gencive marginale humaine incubée pendant seize heures avec du tampon phosphate au pH 7,0.
Coloration à l'hématoxyline-éosine (cas 458/37).

Fig. 6b

Coupe en série incubée pendant seize heures en présence d'élastase dans le tampon phosphate au pH 7,0.
Coloration à l'hématoxyline-éosine (cas 458/34).

Fig. 6c

Coupe témoin de la même biopsie incubée pendant seize heures avec l'élastase et son inhibiteur spécifique, le Pms-F, dans le tampon phosphate au pH 7,0.
Coloration à l'hématoxyline-éosine.
On peut remarquer que les tissus ont gardé leur intégrité malgré la durée de l'incubation. (cas 458/36).

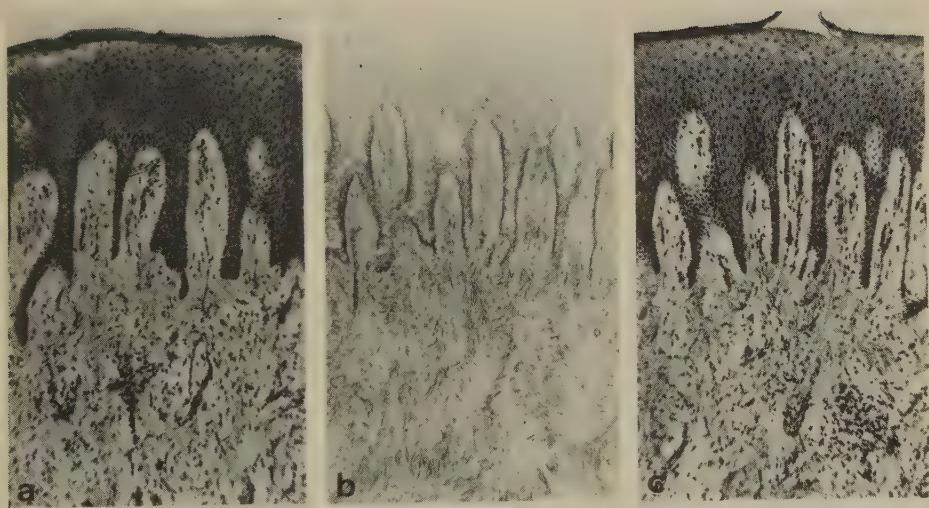


fig. 6.

Figure 7

Fig. 7a

Coupe témoin de la même biopsie que la figure 1 incubée pendant vingt heures avec du tampon acide citrique-citrate de sodium au pH 3,6.

Coloration au trichrome de Goldner. (cas 451/32).

Fig. 7b

Coupe en série incubée pendant six heures avec la fraction granulaire totale dans le tampon acide citrique-citrate de sodium au pH 3,6 et colorée ensuite au trichrome de Goldner.

On observe une diminution générale de la colorabilité au niveau de l'épithélium et du conjonctif. (cas 451/36).

Fig. 7c

Coupe incubée pendant vingt heures avec la fraction granulaire totale dans le tampon acide citrique-citrate de sodium au pH 3,6.

On remarque que le tissu épithélial est encore reconnaissable alors que le conjonctif est complètement détruit. (cas 450/34).

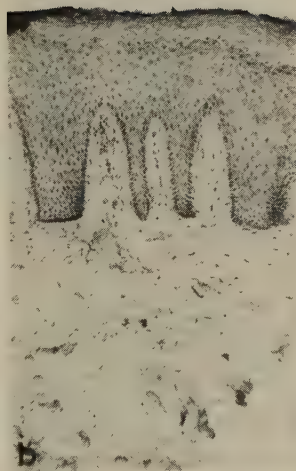


fig. 7.

4. DISCUSSION

La séparation des leucocytes du sang humain par la méthode au dextran a permis d'obtenir une préparation contenant une proportion moyenne de 80 % de leucocytes polynucléaires neutrophiles (PMNs) et 14 % de leucocytes mononucléaires. En travaillant avec des préparations encore plus pures de PMNs ou de mononucléaires obtenues par sédimentation supplémentaire au ficoll-isopaque (13), Ishikawa et Cimasoni (48) ont montré que la fraction granulaire issue des PMNs avait un maximum d'activité au pH neutre, alors que les mononucléaires contenaient principalement des protéases acides ayant un maximum d'activité au pH 3.6. Ce dernier pH correspond à celui de la cathepsine D et il est probable que, lors des incubations avec la fraction granulaire à ce pH, l'effet lytique obtenu sur nos coupes était principalement dû à la cathepsine D.

L'action de la fraction granulaire au pH 7.3 est probablement due à l'activité de trois enzymes : la collagénase, la cathepsine G et l'élastase (55). L'effet lytique de ces trois enzymes a été démontré sur plusieurs variétés de tissus chez les mammifères. A part son action sur le collagène (27,38,37), la collagénase de PMNs est capable de dégrader les protéoglycans du cartilage et du tendon (76). La cathepsine G a également une action sur les protéoglycans du cartilage et le conjonctif de l'état natif (55,65).

L'action de l'élastase quant à elle a été démontrée sur les membranes basales de vaisseaux sanguins et de glomérules rénaux (52) sur la lamina élastique des parois artérielles (52,58), sur les protéoglycans de la matrice de plusieurs variétés de cartilages (55,66,88, 27,47), sur les peptides terminaux du collagène de cartilage (55,27) ainsi que sur le collagène type I de tendon et de peau (88), sur l'élastine des ligaments (11) et sur le fibrinogène humain (75). Les effets lytiques obtenus sur nos coupes par action de la fraction granulaire confirment en général les résultats obtenus par ces auteurs à l'exception des dommages remarqués au niveau de l'épithélium.

Comme le montrent les figures 1b, 1c, 2b, la fraction granulaire au pH 7.3 a en effet provoqué des destructions importantes de l'épithélium, ce qui ne semble pas avoir été décrit auparavant.

La protéase neutre utilisée dans le présent travail a été purifiée selon la méthode décrite par Ishikawa et Cimasoni (49). Ces auteurs ont démontré que cette enzyme avait les mêmes caractéristiques que l'élastase isolée également à partir de PMNs par Janoff en 1973 (54) et par Ohlsson et Olsson en 1974 (76). Pour ce qui est du tissu conjonctif gingival, nos résultats confirment ce que d'autres auteurs ont constaté sur d'autres organes (66,55,27,88). Concernant l'épithélium on a pu au contraire observer que ce tissu était aussi très sensible à l'action de la protéase neutre. En particulier notre travail semble avoir mis en évidence une grande sensibilité du matériel intercellulaire, surtout après coloration par la technique de Hale. Rappelons que cette technique histochimique est spécifique pour les mucopolysaccharides acides, tel l'acide hyaluronique (30). Ce matériel, qui constitue une grande partie de la substance fondamentale du conjonctif et du cartilage, se trouve également au niveau des espaces intercellulaires de l'épithélium gingival (91,42). L'inhibiteur spécifique de l'élastase, le phénylméthane sulfonyl fluoride (Pms-F) a permis de s'assurer que l'altération des coupes soumises à la protéase neutre était bien due à l'attaque enzymatique et non aux charges ioniques de l'enzyme.

Comme nous l'avons énoncé plus haut, il est probable que les destructions tissulaires obtenues par la fraction granulaire au pH acide sont dues à l'action de la cathepsine D. L'action de cette enzyme sur les constituants du tissu conjonctif a été démontrée par plusieurs auteurs (27, 99, 82) et se confirme sur nos coupes de gencive. Rappelons également que la lyse de la membrane basale de l'épithélium, telle que nous l'avons

remarquée sur certaines de nos préparations, confirme les trouvailles d'autres chercheurs au sujet de l'action de la cathepsine D sur des membranes basales au niveau d'autres organes, comme le glomérule rénal ou les vaisseaux (18). Il est aussi important de rappeler que la digestion de tissus par la cathepsine D est accrue en cas d'inflammation, en particulier dans le tissu de granulation (12).

A la question de savoir si la cathepsine D peut jouer un rôle important en milieu extracellulaire, en raison de son activité optimale en pH acide, il semble que l'accumulation de PMNs soit suivie d'une libération d'acide lactique (19), produisant ainsi des micro-zones dans lesquelles les conditions de pH pourraient être suffisamment acides et semblables à celles que l'on trouve dans les vacuoles de phagocytose.

Nos résultats ont été obtenus par des expériences in vitro, ce qui représente une approche artificielle des conditions dans lesquelles se trouvent les tissus gingivaux lors d'une parodontite. Cependant, il est certain que les tissus du parodonte sont, d'une façon ou d'une autre, mis en contact avec des enzymes lysosomiales au cours des parodontolyses inflammatoires.

Une libération plus ou moins grande de ces enzymes pourrait expliquer en partie les différences de comportement de la gencive d'un individu à l'autre, face à une quantité de plaque identique et, chez le même individu, d'une poche parodontale à l'autre.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLISON, A. Lysosomes and disease.
Sci. Amer. 217 : 62-72, 1967.
2. ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and
cathepsin with haemoglobin.
J. Gen. Physiol. 22 : 79-89, 1938.
3. ATTSTRÖM, R., TYNELIUS-BRATTHALL, G. and EGELBERG, W.
Effect of experimental leukopenia on chronic
gingival inflammation in dogs.
J. Period. Res. 6 : 200-210, 1971.
4. BAEHNI, P. Enzymes lysosomiales dans les produits de rinçage
de la région parodontale marginale au cours de la
gingivite expérimentale chez l'homme.
Médecine et Hygiène, Thèse n° 315, 1974.
5. BAEHNI, P., CIMASONI, G.
La réponse immune et les parodontopathies, une
revue de la littérature.
Rev. mens. suisse Odonto-stomatol. 87 : 91-103, 1977.
6. BAEHNI, P., SUDAN, J.M., STEUBE, W. and CIMASONI, G.
Enzymes lysosomiales dans les produits de rinçage de
la région parodontale marginale au cours de la
gingivite expérimentale chez l'homme.
J. Biol. Buccale 3 : 143-156, 1975.
7. BAGGIOLINI, M. The enzymes of the granules of polymorphonuclear
leucocytes and their function.
Enzyme 13 : 132-160, 1972.
8. BAHN, A. Microbial potential in the etiology of periodontal
disease.
J. Periodontol. 41 : 603-610, 1970.

9. BARRETT, A.J. Lysosomal enzymes. In Dingle lysosomes, a laboratory handbook.
Chapter 2, p. 46. North-Holland, Amsterdam, 1972.
10. BARRETT, A.J. In : Lysosomes in biology and pathology. (J.T. Dingle editor), vol. 2 : 288-292 ; North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1969.
11. BAUGH, R.J. and JAMES, T.
Human leukocyte granule elastase : rapid isolation and characterization.
Biochem. 15 (4) : 836-841, 1976.
12. BAZIN, S., DELAUNAY, A.
Role of cathepsins in granulation tissue.
J. Dent. Res, suppl. (2), 51 : 244-249, 1972.
13. BÜYÜK, A.
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (suppl. 97) : 77-89, 1968.
14. CIMASONI, G. The crevicular fluid. Monographs in oral science vol. 3, Ed. by H.M. Myers, S. Karger, Basel, 1974.
15. CIMASONI, G., FIORE-DONNO, G. and HELD, A.J.
Mucopolysaccharide in human epithelium reattachment.
New Zealand Dent. J. 69 : 185-193, 1973.
16. COCHRANE, C.G. Immunologic tissue injury mediated by neutrophilic leukocytes.
Adv. Immunol. 9 : 97, 1968.
17. COCHRANE, C.G. Mediation of immunologic tissue injury.
Adv. Immunol. 9 : 131-146, 1968.
18. COCHRANE, C.G. and AIKIN, B.S.
Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions.
The destruction of vascular membrane in vivo and in vitro. J. Exp. Med. 124 : 733-753, 1966.

19. COHN, Z.A. and MORSE, S.I.

Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leukocytes. I. observations on the requirements and consequences of particule ingestion.

J. Exp. Med. 111 : 667, 1960.

20. COLUB, E.S., SPITZNAGEL, J.K.

The role of lysosomes in hypersensitivity reactions : tissue damage by polymorphonuclear neutrophil lysosomes.

J. Immunol. 95 : 1060-1066, 1960.

21. COURANT, P.R. Periodontal disease. In Oral Microbiology, W.A.

Nolte Ed., C.V. Mosby, St. Louis, 1973.

22. COWLEY, G.C. The initiation of gingival inflammation.

J. Periodont. Res. suppl. no 4 : 21, 1969.

23. DAVIES, P., PAGE, R.C. and ALLISON, A.C.

Changes in cellular enzyme levels and extracellular release of lysosomal acid hydrolases in macrophages exposed to group A streptococcal cell wall substance.

J. Exp. Med. 139 : 1262-1282, 1974.

24. DE DUVE, C. The lysosomes.

Scient. Am. 208 : 64-72, 1963.

25. DE DUVE, C. Die Rolle der Lysosomen in der Zell Pathologie.

Triangel 9 : 200-208, 1970.

26. DINGLE, J.T. Protein catabolism. In : Lysosomes in biol. and pathol. p.228-233. Dingle, J.T. editor,

North-Holland Publishing Co. Amsterdam, 1973.

27. DINGLE, J.T. The role of neutral and acid proteinases in connective

tissue turnover. In : Ribbons. D.W. Brew, K. Ed.

Proteolysis and physiological regulation. N.Y. Academic Press W₃ M 1202 VII; 339-355, 1976.

28. DUBOIS, A.M. Précis de technique histologique.
Institut d'histologie normale et d'embryologie
générale, octobre 1966.
29. ELLISON, S. Oral bacteria and periodontal disease.
J. Dent. Res. 49 : 198-202, 1970.
30. EVERSON PEARSE, A.G. Histochemistry. Theoretical and applied.
3rd Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, London
and New York, 1968.
31. FALLON, H.J., FREI, E., DAVIDSON, J.D., TRIER, J.S. and BURK, D.
Leukocyte preparations from human blood : Evaluation
of their morphologic and metabolic state.
J. Lab. Clin. Med. 59 : 779-791, 1962.
32. FERGUSON, J.B., ANDREWS, J.R., VOYNICK, I. and FRUTON, J.S.
The specificity of cathepsin D.
J. Biochem. Chem. 248 (19) : 6701-6708, 1973.
33. FREEDMAN, H.L., TAICHMAN, N.S. and KEYSTONE, J.
Local release of lysosomal enzymes during mixed
bacterial infection in the skin of rabbits.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125 : 1209-1213, 1967.
34. GIBBONS, R.J. Dental plaque.
Edited by Mc Hugh, W.P., London, E. and Livingstone, S.
1970.
35. GLICKMAN, I. Periodontal disease.
New Engl. J. Med. 284 : 1071-1077, 1971.
36. GOETTlich-RIEMANN, W., YOUNG, J.O. and TAPPEL, A.L.
Cathepsins D, A and B and the effect of pH
in the pathway of protein hydrolysis.
Biochim. Biophys. Acta 243 : 137-146, 1971.
37. GOLUB, L.M., STAKIW, J.E. and SINGER, D.I.
Collagenolytic activity of human gingival crevice fluid.
J. Dent. Res. 53 : 1501, 1974.

38. GOLUB, L.M., SIEGEL, K., RAMAMURTHY, N.S. and MANDEL, J.D.
Some characteristics of collagenase activity in
gingival crevicular fluid and its relationship to
gingival diseases in humans.
J. Dent. Res. 55 (6) : 1049-1057, 1976.
39. GUSTAFSON, G.T. Increased susceptibility to periodontitis in
mink affected with a lysosomal disease.
J. Periodont. Res. 4 : 259-267, 1969.
40. HASEGAWA, K., CIMASONI, G. and VUAGNAT, P.
Inflamed gingivae contain more free lysosomal enzyme.
Experientia 31 : 765-766, 1975.
41. HAWKINS, D. Neutrophilic leukocytes in immunologic reactions :
evidence for selective release of lysosomal consti-
tuents.
J. Immunol. 108 (2) : 310-317, 1972.
42. HELD, A.J. and CIMASONI, G.
Intercellular mucopolysaccharides in human gingival
epithelium.
Archs Oral Biol. 9 : 751-752, 1964.
43. HENSON, P.M. Pathologic mechanisms in neutrophil-mediated injury.
Amer. J. Pathol. 68 : 593-612, 1972.
44. HIRSCH, J.G. and COHN, Z.A.
Degranulation of polymorphonuclear leukocytes
following phagocytosis of micro-organisms.
J. Exp. Med. 112 : 1005, 1960.
45. HORTON, J.E., OPPENHEIM, J.J. and MERGENHAGEN, S.E.
A role for cell-mediated immunity in the pathogenesis
of periodontal disease.
J. Periodontol. 45 : 351-360, 1974.
46. HULIN, C. Les parodontoses pyorrhéiques ou pyorrhées alvéolaires.
Ed. R. Foulon, 1941.

47. IGNARRO, L.J., ORONSKY, A.L. and PERPER, R.J.
Breakdown of non-collagenous chondromucoprotein
matrix by leukocyte lysosome granule lysates from
guinea pig, rabbit and human.
Clin. Immunol. Immunopathol. 2 : 36-51, 1973.
48. ISHIKAWA, I. and CIMASONI, G.
Isolation of cathepsin D from human leucocytes.
Biochim.Biophys. Acta 480 : 228-240, 1977.
49. ISHIKAWA, I. and CIMASONI, G.
Partial purification of a neutral protease from
polymorphonuclear leukocytes and its proteolytic
effect on immunoglobulin G.
Archs oral Biol. 23: 933-940, 1978.
50. ISHIKAWA, I., CIMASONI, G. and AHMAD-ZADEH, C.
Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis
of periodontitis : a study on cathepsin D in human
gingival fluid.
Archs oral Biol. 17 : 111-117, 1972.
51. IVANYI, L., WILTON, J.M.A. and LEHNER, T.
Cell mediated immunity in periodontal disease;
Citotoxicity, migration and lymphocyte transformation
studies.
Immunol. 22 : 141-145, 1972.
52. JANOFF, A.D. Mediators of tissue damage in leukocyte lysosome.
Further studies on human granulocyte elastase.
Lab. Invest. 22 : 228, 1970.
53. JANOFF, A.D. Human granulocyte elastase. Further delineation
of its role in connective tissue damage.
Am. J. Pathol. 68 : 579-792, 1972.
54. JANOFF, A.D. Purification of human granulocyte elastase by
affinity chromatography.
Lab. Invest. 28 : 458-468, 1973.

55. JANOFF, A.D. At least three human neutrophil lysosomal proteases are capable of degrading joint connective tissues. Ann. N.Y. Acad. Sci. 256 : 402-408, 1975.
56. JANOFF, A.D. and BLONDIN, J.
Depletion of cartilage matrix by a neutral protease fraction of human leukocyte lysosomes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135 : 302-306, 1970.
57. JANOFF, A.D., SANDHAUS, R.A. and HOSPELHORN, V.P.
Digestion of lung proteins by human leukocyte granules in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140 : 576-579, 1972.
58. JANOFF, A.D. and SCHERER, J.
Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX : Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 128 : 1137-1151, 1968.
59. JANOFF, A.D. and ZELIGS, J.P.
Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leukocytes. Science 161 : 702-704, 1968.
60. KELSTRUP, J., THEILADE, E.
Microbes and periodontal disease. J. Clin. Periodontol. I : 15-35, 1974.
61. LANGE, D.E. and SCHROEDER, H.E.
Structural localization of lysosomal enzymes in gingival sulcus cells. J. Dent. Res. 51 : 272-273, 1972.
62. LEHNER, T., WILTON, J.M.A., CHALLACOMBE, S.J. and IVANYI, L.
Sequential cell-mediated immune responses in experimental gingivitis in man. Clin. Exp. Immunol. 16 : 481-492, 1974.

63. LINDHE, J., HAMP, S.E. and LÖE, H.
Plaque induced periodontal disease in beagle dogs.
A 4-year clinical, roentgenographical and histochemical study.
J. Periodontal. Res. 10 : 243-255, 1975.
64. LÖE, H., THEILADE, E. and JENSEN, B.
Experimental gingivitis in man.
J. Periodont. 36 : 177-187, 1965.
65. MALEMUD, C. and JANOFF, A.
Human polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G mediate the degradation of lapine articular cartilage proteoglycan.
Ann. N.Y. Acad. of Sciences : 132-139, 1975.
66. MALEMUD, C. and JANOFF, A.
Identification of neutral proteases in human neutrophil granules that degrade articular cartilage proteoglycans.
Arthrit. Rheum. 18 (4) : 361-368, 1975.
67. MANDEL, I.D. Dental plaque : Nature, formation and effect.
J. Periodont. 37 : 357, 1966.
68. MATTER, J. La plaque bactérienne, cause directe de gingivite puis de parodontite. Une analyse de la littérature moderne.
Rev. Mens. Suisse Odonto-stomatol. 84 : 469-480, 1974.
69. MERGENHAGEN, S., TEMPEL, T. and SNYDERMAN, R.
Immunologic reactions and periodontal inflammation.
J. Dent. Res. 49 : 256-261, 1970.
70. MITROVIC, D. Proteases lysosomiales et inflammation locale.
Rev. Rhumatisme 37 : 741-749, 1970.
71. MOVAT, H.Z., URIUHARA, T., TAKEUCHI, Y. and MACMORINE, D.R.
The role of PMN leukocyte lysosomes in tissue injury,

inflammation and hypersensitivity.

Int. Arch. Allergy 40 : 197-217, 1971.

72. MUHLEMANN, H.R., RATEITSCHAK, K.H. and RENGGLI, H.
Parodontologie.
Georg Thieme, 1975.
73. NISENGARD, R., BEUTNER, E.H. and HAZEN, S.P.
Immunologic studies of periodontal disease.
IV : Bacterial hypersensitivity and periodontal
disease.
J. Periodont. 39 : 329, 1968.
74. NEZELOF, C., GALLE, P. and HINGLAIS, N.
Techniques microscopiques.
Ed. Flammarion, Médecine-Science, 1972.
75. OHLSSON, K. Properties of leukocytic protease.
Clin. chim. Acta 32 : 399-405, 1971.
76. OHLSSON, K. and OLSSON, I.
The neutral proteases of human granulocytes.
Isolation and partial characterization of granulocyte
elastases.
Eur. J. Biochem. 42 : 519-527, 1974.
77. ORONSKY, A.L. and PERPER, R.J.
Connective tissue degrading enzymes of human
leukocytes.
Ann. N.Y. Acad. Sciences 233-253, 1975.
78. ORONSKY, A., IGNARRO, I. and PERPER, R.
Release of cartilage mucopolysaccharid degrading
neutral protease from human leukocytes.
J. Exp. Med. 138 : 461-467, 1973.
79. PAGE, R.C., DAVIES, P. and ALLISON, A.C.
Effects of dental plaque on the production and
release of lysosomal hydrolases by macrophages

culture.

Arch. Oral Biol. 18 : 1481-1495, 1973.

80. PAGE, R. and SCHROEDER, H.

Pathogenesis of inflammatory periodontal disease.

A summary of current work.

Lab. Invest. 33 : 235-248, 1976.

81. PERPER, R.J. and ORONSKY, A.L.

Enzyme release from human leukocytes and degradation
of cartilage matrix.

Arthritis and Rheumatism. 17 (1) : 47-55, 1974.

82. SAPOLSKY, A.I., ALTMAN, R.D., WOESSNER, J.F. and HOWELL, D.S.

The action of cathepsin D in human articular cartilage
on proteoglycans.

J. Clin. Invest. 52 : 624-632, 1973.

83. SIMON, B.I., GOLDMAN, H. , RUBEN, M. and BAKER, E.

The role of endotoxin in periodontal disease.

II. Correlation of the quantity of endotoxin in human
gingival exudate with the clinical degree of inflammation.

J. Periodont. 41 : 81-86, 1970.

84. SKOOG, W.A. and BECK, W.

Studies on fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin
methods of isolating leukocytes.

Blood 11 : 436-454, 1956.

85. SNYDERMAN, R. Role for endotoxin and complement in periodontal
tissue destruction.

J. Dent. Res. 51 : 356-361, 1972.

86. SNYDERMAN, R. Immunological mechanisms of periodontal tissue
destruction.

J. Amer. Dent. Ass. 87 : 1020-1026, 1973.

87. SOCRANSKY, S.S. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease.
J. Dent. Res. 49 : 203-222, 1970.
88. STARKEY, P.M., BARRETT, A.J. and BURLEIGH, M.C.
The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases.
Biochim. Biophys. Acta 483 : 386-397, 1977.
89. TAICHMAN, N.S. Mediation of inflammation by the polymorphonuclear leucocytes as a sequela of immune reactions.
J. Periodontol. 41 : 228-231, 1970.
90. THEILADE, E., WRIGHT, W.H., JENSEN, B. and LÖE, H.
Experimental gingivitis in man. II : A longitudinal clinical and bacteriological investigation.
J. Periodont. Res. 1 : 1-13, 1966.
91. THONARD, J.C. and SCHERP, H.W.
Histochemical demonstration of acid munopoly-saccharides in human gingival epithelial intercellular spaces.
Archs oral Biol. 7 : 125-136, 1962.
92. TYNELIUS-BRATTHALL, G. and ATTSTRÖM, R.
Acid phosphatase, hyaluronidase and protease in crevices of healthy and chronically indlamed gingiva in dogs.
J. Dent. Res. 51 : 279-283, 1972.
93. VALAZZA, A., MATTER, J., OGILVIE, A. and CIMASONI, G.
Fluide gingival, inflammation gingivale, profond des poches et perte osseuse.
Rev. Mens. Suisse odonto-stomatol. 82 : 824-832, 1972.
94. VALAZZA, A., MATTER, J., OGILVIE, A. and CIMASONI, G.
Phosphatase acide, beta-glucuronidase et cathepsine D dans des micro-quantités de fluide gingival
Rev. Mens. Suisse odonto-stomatol. 83 :123-132, 1973.

95. WEISSMANN, C. The role of lysosomes in inflammation and disease.
Ann. Rev. Med. 18 : 97-112, 1967.
96. WEISSMANN, G. and SPILBERG, I.
Breakdown of cartilage protein polysaccharide
by lysosomes.
Arthritis Rheum. 11 : 162, 1968.
97. WEISSMANN, G., ZURIER, R.B. and HOFFSTEIN, S.
Leukocytic proteases and the immunologic release
of lysosomal enzymes.
Amer. J. Pathol. 68(3) : 539-559, 1972.
98. WINER, R.A., O'DONNELL, L.J., CHAUNCEY, H.H. and MC NAMARA, T.F.
Enzyme activity in periodontal disease.
J. Periodontol. 41 : 449-456, 1970.
99. WOESSNER, J.K. Cathepsin D : enzymatic properties and role
in connective tissue breakdown. In : Tissue
proteinases, Ed. J.T. Dingle, North Holland
Pub. Co. 291-302, 1971.
100. WRIGHT, D. and MALAWISTA, S.
The mobilization and extracellular release of
granular enzymes from human leukocytes during
phagocytosis.
J. Cell. Biol. 53 : 788-797, 1972.

